



⑫ Offenlegungsschrift
⑪ DE 3516017 A1

⑮ Int. Cl. 4:
C 07 K 3/02
C 07 K 3/26
C 07 K 15/00

⑯ Aktenzeichen: P 35 16 017.9
⑰ Anmeldetag: 2. 5. 85
⑱ Offenlegungstag: 27. 11. 86

THE BRITISH LIBRARY

5 DEC 1986
SCIENCE
REFERENCE LIBRARY

DE 3516017 A1

⑲ Anmelder:
Kittel, Jochen, 1000 Berlin, DE

⑳ Erfinder:
gleich Anmelder

⑷ Verfahren zur Herstellung membranständiger Proteine aus biologischem Material zur Anwendung im
biologischen Systemen

DE 3516017 A1

3516017

SCHUTZANSPRÜCHE :

- 1.) Verfahren zur Herstellung funktionsfähiger Proteinspezies aus biologischen Membranen, dadurch gekennzeichnet, daß eine Detergensklasse A limitiert zu einer Suspension gegeben wird.
- 2.) Verfahren nach 1.), dadurch gekennzeichnet, daß ein Hilfsdetergens B verwendet wird.
- 3.) Verfahren nach 1.) und 2.), dadurch gekennzeichnet, daß das Hilfsdetergens abdialysierbar ist.
- 4.) Verfahren nach 1.) und 2.) und/oder 3.), dadurch gekennzeichnet, daß die so hergestellten Substanzen in biologischen oder biomedizinischen Test- und/oder Herstellungssystemen Verwendung finden.

VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG MEMBRANSTÄNDIGER PROTEINE AUS
BIOLOGISCHEM MATERIAL ZUR ANWENDUNG IN BIOLOGISCHEN SYSTEMEN.

In der modernen Biochemie erweitern sich ständig die Einsatzmöglichkeiten für biologische Analysen-, Test- oder Herstellungsverfahren, insbesondere unter Einsatz von Proteinen oder anderen Stoffen, welche aus den Membranen der Zelloberfläche, der Mitochondrien, der Mikrosomen, der Kernmembran oder anderer Zellorganellen stammen.

Solche membranständigen Proteine sind von herausragender Bedeutung, da sie in vielfältiger Weise die Beziehungen der Zellkompartimente, der Zellen und der Gewebe eines Organismus untereinander kontrollieren und regulieren und dabei den Gesamtzustand der Einzelzelle (Zellstoffwechsel) steuern, als auch ihre Beziehungen nach außen (Nahrungs- und Körperstoffwechsel, Zell-Erkennung, Komplement- und Immunreaktionen) bestimmen.

Membranständige Proteine sind in ihrer natürlichen Umgebung in eine jeweils ganz spezifische Membran von Lipiden oder lipidähnliche Substanzen eingebaut. Die Zusammensetzung der Lipide ist jedoch sehr variant und abhängig von z. B.: Spezies, Stamm, Geschlecht, Alter und Ernährungszustand des Individuums, dem das Gewebe entnommen wurde und von der Art und dem Entwicklungszustand des Protagonisten und dem Ort des Vorkommens in der Zelle selbst.

Für viele membranständige Proteine wurden Darstellungsmethoden entwickelt, die geeignet sind für die Durchführung von analytischen und kinetischen Versuchen oder für Untersuchungen zur Struktur oder Wirkungsweise dieser Proteine.

Beim Einsatz der so dargestellten, membranständigen Proteine in sensible biologische Test- oder Kultursysteme traten jedoch praktisch unüberwindliche Schwierigkeiten auf, da sich die Stoffe (- Detergenzien A -), die zur Herauslösung der Proteine aus ihrer natürlichen Umgebung notwendig sind, für das biologische Material der Test- oder Kultursysteme (Einzelzellen, Gewebekulturen) als toxisch erwiesen.

Der Grund hierfür ist hauptsächlich darin zu sehen, daß sich die Detergenzien A im lipophilen Bereich der Proteine auf Grund der lipophilen Wechselwirkung stets im Überschuß anlagern und sich diese überschüssigen Detergenzien A dann beim Einsatz in empfindlichen Test- oder Kultursystemen in die Membranen der Test- oder Kulturobjekte einlagern und dort den Metabolismus stören oder unterbinden, z. B. durch Veränderung oder Entkoppelung der membranständigen Proteinfunktion, bzw. durch lytische, inhibierende oder toxische Wirkung per se.

Der erfindungsgemäße Gedanke ist nun der, zur Herauslösung der membranständigen Proteine nur eine so minimale Menge an Detergens A zu verwenden, daß beim Einsatz der solubilisierten (in beständige Lösung überführten) Proteine in Test- oder Kultursysteme wie oben beschrieben eine toxische Wirkung unterbleibt, da Detergens A nicht im Überschuß vorhanden ist.

Es hat sich jedoch gezeigt, daß die Minimalkonzentration an Detergens A, die zur Solubilisierung der Proteine erforderlich ist, für viele Anwendungszwecke bereits zu toxisch wirkt, wenn die Solubilisierung mit dem Detergens A alleine vorgenommen wird.

Deswegen wird weiter vorgeschlagen, ein Hilfsdetergens B einzusetzen, das physiologisch verträglich ist und bis zu einem geringen Restbestand -der dazu erforderlich ist, das präparierte Protein in Lösung zu halten- wieder durch Dialyse entfernt werden kann.

Auf Grund der lipophilen Wechselwirkung zwischen Lipiden, Detergenzien A und den Abschnitten der membranständigen Proteine im Bereich der Einbettung dieser Proteine in der Membran ist die gewünschte Besetzung der lipophilen Proteinbereiche in minimalster Konzentration Detergens A durch die Einstellung eines Gleichgewichtes gegen eine Dialysierflüssigkeit mit vorgegebener Konzentration Detergens A nicht möglich: Der entstehende "Schwarm" von Detergens A-Molekülen um die fraglichen Proteinstrukturen würde sofort wieder zu einer über das tolerierbare Maß hinausgenden Anlagerung führen.

Vielmehr erreicht man aber diese, für eine "Minimalsolubilisation" der membranständigen Proteine notwendige Anlagerung von Detergens A dergestalt, daß zu einem bestehenden Dialysesystem mit einer bekannten Menge Protein in den Membranfraktionen bekannter Herkunft eine festgelegte Menge Detergens A von außen zugegeben wird.

Nur durch langsame Diffusion in das proteinhaltige Dialysat läßt sich die Anlagerung von Detergens A kontrollieren und limitieren.

Arbeitsvorschrift:

Nach einem der an sich bekannten Verfahren werden in sich einheitliche Fraktionen von Zellmembranen gewonnen (Aufschluß; french-press, Ultrabeschallung, Homogenisierung, Zentrifugationen u.s.w.) und in Puffer B (enthält Detergens B) aufgenommen und homogenisiert. Nach diesem Prozeß soll die Proteinkonzentration im Dialysat 2 - 8 mg Protein / ml betragen. Diese Lösung wird genau (μ l) gemessen und in z. B. einen vorgequollenen Dialyseschlauch gefüllt. Die Dialyse erfolgt gegen etwa das 2 - 8-fachen, vorzugsweise gegen das 4-fache Volumen Puffer B. Das Dialysat wird stark gerührt und dann Detergens A tropfenweise in genau vorausberechneter Menge über einen größeren Zeitraum - z. B. 30 min. - zugegeben. Man läßt 2 Stunden weiterröhren, entnimmt den Dialyseschlauch und zentrifugiert das Dialysat. Dabei ist die Zentrifugation anhaltsweise nach der Größe und der Herkunft der Ausgangsmembranen zu bemessen.

Je nach Verwendungszweck kann das Dialysat vor der Zentrifugation vorsichtig auf z. B. das doppelte Volumen mit einer geeigneten Lösung - z. B. Kulturmedium oder Puffer B ohne Detergens B - verdünnt werden. So erhält man oft einen Niederschlag von vergleichbarer Größe des Ausgangsmaterials, wobei aber das herausgelöste Protein im Überstand verbleibt.

- 2 -

4.

Die so gewonnenen Substanzen können in üblicher Weise weiterverarbeitet werden.

Z. B. können die Proteine einer Ammonsulfatfällung unterzogen und wieder aufgelöst werden, Glykoproteine lassen sich mit Polyäthylenglycol-Aceton fällen, das Gesamtgemisch kann z. B. durch isoelektrische Fokussierung oder Gelelektrophorese oder einer Kombination davon gereinigt oder nach dem Vorschlag des Entwicklungsbüros Dr. Busse, Berlin hochauflösend analysiert werden. Ebenso ist es möglich, die Proteine kationisch bzw. anionisch zu binden und entsprechend abzulösen oder mit bekannten Affinitätstechniken über die Bindung an Substrate oder Substrat-analoga zu reinigen.

Insbesondere sind die so gewonnenen Proteine nicht denaturiert und besitzen die normale metabolische Aktivität und die unveränderten antigenen Determinanten.

Sie lassen sich als metabolisch aktive Spezies in biologischen Testsystemen einsetzen (Suspensionen von Zellorganellen, Lösungen von Enzymen oder Makromolekülen, Zell- oder Gewebekulturen, Kulturen von limb- buds, whole embryos, Eier, Organschnitte u.s.w.) oder direkt oder in weiter gereinigter Form zur Immunisierung verwenden.

Die Stimulierung von B- Lymphozyten zur Produktion von Antikörpern ist in-vitro möglich. Hierbei kann das antigene Material in hoher Konzentration vorgelegt werden, da noch verbleibendes Detergens selbst in kleinen Voluminas, wie z.B. in den vials von Titerplatten keine erkennbare toxische Wirkungen entfaltet.

DETERGENSKLASSE A : Brij 58^x oder Lubrol WX^x oder Emulgen 911^x oder Triton X- 100^x oder Renex 690^x.

DETERGENSKLASSE B : Cholsäure- Na- Salz oder Zwittergent^x.
x = registrierte Handelsnamen.

Puffer B: 40 mM Phosphat/Hydrogenphosphat, pH = 7,2 bis 6,6
20 % Glycerin(v/v), 0,1 mM butyliertes Hydroxytoluol
200 mM Sucrose
100 mM Dithioerythritol
0.4 % Detergens B (v/v)

<u>Beispiel:</u>	<u>Ausgangsmaterial</u>	<u>Detergens A</u>	<u>bevorzugt</u>	<u>Ausbeute Pro</u>
Sprague-	Mitochondrien l.	2 - 6	(μ Mol	92 % \pm 4%
Dawley	Mikrosomen l.	2 - 5	3,5	95 % \pm 4%
Ratte, m, 120 g, Normaldiät	Mitochondrien b. Mikrosomen b. liver (l.) surf. brain (b.) surf.	3 - 8 3 - 7 4 - 10 4 - 10	mg Prot.) 4,5 4,0 5,0 5,2	90 % max. 90 % max. 92 % \pm 4% 90 % max.